



REC'D 23 AUG 1999

WIPO PCT

4
FR99/1901

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

**PRIORITY
DOCUMENT**SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)**COPIE OFFICIELLE**

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le **06 AOUT 1999**Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLESIEGE
26 bis, rue de Saint Petersburg
75800 PARIS Cedex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04
Télécopie : 01 42 93 59 30

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

Confirmation d'un dépôt par télécopie ☐

Cet imprimé est à remplir à l'encre noire en lettres capitales

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : (1) 42.94.52.52 Télécopie : (1) 42.93.59.30

Réservé à l'INPI

DATE DE REMISE DES PIÈCES

31. JUL 1998

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

98 09886 -

DÉPARTEMENT DE DÉPÔT

DATE DE DÉPÔT

31 JUL 1998

1

NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE
À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE

CABINET LAVOIX
2 Place d'Estienne d'Orves
75441 PARIS CEDEX 09

2 DEMANDE Nature du titre de propriété industrielle

☒ brevet d'invention

☐ demande divisionnaire

☐ certificat d'utilité

☐ transformation d'une demande
de brevet européen

☒ demande initiale

☐ brevet d'invention

n° du pouvoir permanent : références du correspondant

téléphone

BIF 98/0255

53-20-14-20

date

Établissement du rapport de recherche

☐ différé

☒ immédiat

Le demandeur, personne physique, requiert le paiement échelonné de la redevance

☐ oui

☐ non

Titre de l'invention (200 caractères maximum)

Utilisation de nouveaux agents inducteurs de mort cellulaire en synergie avec les interférons.

3 DEMANDEUR (S)

n° SIREN

code APE-NAF

Nom et prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination

Forme juridique

INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE (INSERM)
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (C.N.R.S.)

Nationalité (s)

Française, Française

Adresse (s) complète (s)

101 Rue de Tolbiac, 75013 PARIS
3, rue Michel Ange 75016 PARIS

Pays

FR
FR

4 INVENTEUR (S) Les inventeurs sont les demandeurs

☐ oui

En cas d'insuffisance de place, poursuivre sur papier libre

☒ non

Si la réponse est non, fournir une désignation séparée

5 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES

☐ requise pour la 1ère fois

☐ requise antérieurement au dépôt ; joindre copie de la décision d'admission

6 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE

pays d'origine

numéro

date de dépôt

nature de la demande

7 DIVISIONS antérieures à la présente demande n°

date

n°

date

8 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE

(nom et qualité du signataire - n° d'inscription)

CABINET LAVOIX

M. OBOLANSKY n° 92.1186

SIGNATURE DU PRÉPOSÉ À LA RÉCEPTION

SIGNATURE APRES ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE À L'INPI

DÉSIGNATION DE L'INVENTEUR

(si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

DEPARTEMENT DES BREVETS

26bis, rue de Saint-Petersbourg
75800 Paris Cédex 08
Tél. : 01 53 04 53 04 - Télécopie : 01 42 93 59 30

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

98 09886

TITRE DE L'INVENTION : Utilisation de nouveaux agents inducteurs de mort cellulaire en synergie avec les interférons.

LE(S) SOUSSIGNÉ(S)

- 1) INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE (INSERM)
- 2) CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (C.N.R.S.)
 - 1) 101 Rue de Tolbiac,
75013 PARIS FRANCE
 - 2) 3, rue Michel Ange
75016 PARIS FRANCE

DÉSIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) (indiquer nom, prénoms, adresse et souligner le nom patronymique) :

- 1) KOKEN Marcel
15, Allée Darius Milhaud
Appt. 116
75019 PARIS
FRANCE
- 2) QUIGNON Frédéric
6 Passage Charles Dallery
75011 PARIS
FRANCE
- 3) De THE Hugues
146, rue de l'Université
75007 PARIS
FRANCE
- 4) AMEISEN Jean-Claude
35 bis rue Henri Barbusse
75005 PARIS
FRANCE
- 5) De BELS Frédéric
c/o M. Bilan
5 rue Frédéric Loliée
75020 PARIS
FRANCE

NOTA : A titre exceptionnel, le nom de l'inventeur peut être suivi de celui de la société à laquelle il appartient (société d'appartenance) lorsque celle-ci est différente de la société déposante ou titulaire.

Date et signature (s) du (des) demandeur (s) ou du mandataire

Paris, le 2 août 1999

CABINET LAVOIX
M. OBOLENSKY n° 92.1186



DOCUMENT COMPORTANT DES MODIFICATIONS

[illegible]

Un changement apporté à la rédaction des revendications d'origine, sauf si celui-ci découle des dispositions de l'article R.612-36 du code de la Propriété Intellectuelle, est signalé par la mention « R.M. » (revendications modifiées).

La présente invention concerne l'utilisation de nouveaux agents inducteurs de mort cellulaire, et en particulier d'un agent permettant la surexpression de la protéine PML sur les corps nucléaires, en association avec des interférons, pour induire la mort de cellules indésirables.

5 Les corps nucléaires sont des structures associées à la matrice nucléaire, de fonction inconnue, et qui contiennent un certain nombre de protéines incluant PML, Sp100, ISG20, PIC-1/SUMO-1, Isp100, PLZF, Int-6, CBP, Rb, RFP et la protéine P ribosomale (Lamond et al, 1998). Le gène codant pour la protéine PML (pour "ProMyelocytic Leukemia") a été identifié à partir de sa fusion avec le gène *RAR α* (récepteur nucléaire de l'acide rétinoïque) dans la translocation t(15;17) trouvée chez des patients atteints de leucémie promyélocytique aiguë ("Acute Promyelocytic Leukemia" - APL). Ce gène *PML* est un gène cible des interférons, et sa surexpression provoque un arrêt de la croissance de certaines lignées cellulaires (Koken et al, 1995). Dans les cellules malignes APL, la protéine PML n'est pas localisée sur les corps nucléaires mais délocalisée du fait de l'expression de PML-*RAR α* . L'oxyde d'arsenic induit le retour de PML vers sa localisation normale ainsi que la mort de la cellule. Dans les cellules normales non APL, où la localisation de PML est normale, l'arsenic induit l'agrégation de PML vers de larges corps modifiés, mais le phénomène ne s'accompagne pas de mort cellulaire (Zhu et al, 1997).

20 Les auteurs de l'invention ont à présent découvert que la surexpression de la protéine PML localisée sur les corps nucléaires provoque la mort de la cellule, par un mécanisme original différent de celui de l'apoptose induite par les caspases.

25 La conséquence majeure de cette découverte est qu'une substance favorisant l'adressage de la protéine PML vers les corps cellulaires et/ou sa stabilisation, est particulièrement utile pour induire la mort de cellules indésirables.

30 Lesdites substances qui induisent l'adressage de la protéine PML vers les corps nucléaires et/ou sa stabilisation, peuvent être identifiées par des tests standard connus de l'homme du métier, la mesure du transit intracellulaire entre les fractions cytoplasmique et nucléoplasmique et la fraction associée aux corps nucléaires et la stabilisation de la protéine PML pouvant être notamment réalisée par Western Blot.

Lesdites cellules indésirables peuvent être notamment des cellules d'une tumeur, des cellules infectées par un virus, un parasite ou une bactérie, des cellules immunitaires participant à une réaction immunitaire inappropriée, des cellules génétiquement altérées, des cellules sénescents ou hyperplasiques

5 Par "tumeur", on entend toute prolifération cellulaire indésirable, bénigne ou maligne, incluant notamment les cancers solides et les leucémies et lymphomes. Parmi les tumeurs malignes, on peut citer en particulier les leucémies myéloïdes chroniques et les mélanomes.

10 La présente invention a donc pour objet l'utilisation d'au moins une substance favorisant l'adressage de la protéine PML vers les corps nucléaires et/ou sa stabilisation pour la fabrication d'un médicament destiné à induire la mort de cellules indésirables, à l'exception des cellules leucémiques de la leucémie promyélocytique aiguë lorsque ladite substance est un composé de l'arsenic.

15 L'expression de la protéine PML étant induite par des interférons, la présence d'interférons, qu'ils soient d'origine endogène ou administrés au patient de manière simultanée ou séquentielle, est nécessaire à l'efficacité du traitement envisagé.

20 De manière surprenante, les auteurs de la présente invention ont plus particulièrement découvert que le zVAD (benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp(O-méthyl)-fluorométhylcétone) d'une part stabilise la protéine PML et d'autre part accélère la mort cellulaire induite par les interférons.

25 Or, le zVAD est initialement connu comme inhibiteur des caspases, protéases impliquées dans le processus d'apoptose (Salvesen et al, 1997). Des études (McCarthy et al, 1997) ont en outre montré que le zVAD empêchait ou retardait fortement la mort cellulaire. La découverte des auteurs de la présente invention, selon laquelle le zVAD ne bloque pas la mort cellulaire induite par les interférons mais au contraire l'accélère, va donc à l'encontre des résultats que pouvait attendre l'homme du métier.

30 La présente invention a plus particulièrement pour objet l'utilisation d'un inhibiteur et/ou substrat de caspases, tel que le zVAD, pour la fabrication d'un médicament destiné à induire la mort de cellules indésirables.

Par « substrat de caspases », on entend tout composé capable de se lier aux caspases.

Les auteurs de la présente invention ont également découvert que l'arsenic, et plus particulièrement le trioxyde d'arsenic, d'une part favorise l'adressage de la protéine PML vers les corps cellulaires et d'autre part accélère la mort cellulaire induite par les interférons.

5 La présente invention a plus particulièrement pour objet l'utilisation d'un composé de l'arsenic ou d'un composé ayant les mêmes propriétés biologiques que l'arsenic pour la fabrication d'un médicament destiné à induire la mort de cellules indésirables, à l'exception des cellules leucémiques de la leucémie promyélocytique aiguë.

10 Parmi les composés de l'arsenic, on peut citer notamment le trioxyde d'arsenic.

Par « composé ayant les mêmes propriétés biologiques que l'arsenic », on entend tout composé qui, comme l'arsenic, est un inhibiteur de phosphatase et/ou est capable de créer des adduits covalents par liaison avec
15 des groupements dithiols.

Les inhibiteurs et/ou substrats de caspases ou les composés de l'arsenic ou les composés ayant les mêmes propriétés biologiques que l'arsenic sont de préférence utilisés, pour induire la mort des cellules indésirables, en association avec la protéine PML, et/ou avec un agent induisant la surexpression
20 de la protéine PML. Parmi les agents induisant la surexpression de la protéine PML, on utilise de préférence un interféron, tel que l'interféron α ou β .

En effet les auteurs de la présente invention ont plus particulièrement découvert que les substrats de caspases, et en particulier le zVAD, ainsi que les composés de l'arsenic, en particulier le trioxyde d'arsenic,
25 agissaient de manière synergique avec les interférons pour induire et accélérer la mort cellulaire.

L'administration de manière simultanée ou séquentielle de PML ou d'un agent induisant la surexpression de la protéine PML, tels que les interférons, peut être inutile si la quantité de PML ou d'agent induisant la surexpression de la
30 protéine PML, tels que les interférons, d'origine endogène, est suffisante. Néanmoins, selon un mode préféré de réalisation de l'invention, l'administration d'une substance choisie parmi les composés de l'arsenic, les composés ayant les mêmes propriétés biologiques que l'arsenic et les inhibiteurs et/ou substrats des caspases, est associée à une administration simultanée ou séquentielle de

protéine PML, et/ou d'un agent induisant la surexpression de la protéine PML, tels que les interférons.

Fait partie de l'invention l'utilisation d'une substance choisie parmi les composés de l'arsenic, les composés ayant les mêmes propriétés biologiques que l'arsenic et les inhibiteurs et/ou substrats des caspases, en association avec
5 un interféron, pour induire la mort de cellules indésirables, que celle-ci soit médiée par la protéine PML induite par ledit interféron ou par un autre mécanisme également induit par ledit interféron.

La présente invention a également pour objet une méthode de
10 traitement thérapeutique, dans laquelle on administre à un patient nécessitant un tel traitement une quantité thérapeutiquement efficace d'au moins une substance choisie parmi les composés de l'arsenic, les composés ayant les mêmes propriétés biologiques que l'arsenic et les inhibiteurs et/ou substrats des caspases, en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

De manière préférentielle on administre également audit patient une
15 quantité thérapeutiquement efficace de protéine PML, et/ou d'un agent induisant la surexpression de la protéine PML, tel qu'un interféron, de manière simultanée ou séquentielle.

La présente invention a également pour objet une composition
20 pharmaceutique contenant

- 1) soit au moins un inhibiteur et/ou substrat des caspases associé à :
 - au moins un composé de l'arsenic ou un composé ayant les mêmes propriétés biologiques que l'arsenic;
 - et/ou la protéine PML
 - 25 - et/ou au moins un agent induisant la surexpression de la protéine PML, tel qu'un interféron;
 en présence d'un véhicule pharmaceutiquement acceptable ;
- 2) soit au moins un composé de l'arsenic ou un composé ayant les mêmes propriétés biologiques que l'arsenic associé à la protéine PML et/ou à au moins
30 un agent induisant la surexpression de la protéine PML, tel qu'un interféron, en présence d'un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

La présente invention a également pour objet une composition un kit comprenant

a) - une composition pharmaceutique (1) contenant au moins un inhibiteur et/ou substrat des caspases, en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable ;

5 - et/ou une composition pharmaceutique (2) contenant au moins un composé de l'arsenic ou un composé ayant les mêmes propriétés que l'arsenic, en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable ; et

b) - une composition pharmaceutique (3) contenant la protéine PML en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable;

10 - et/ou une composition pharmaceutique (4) contenant au moins un agent induisant la surexpression de la protéine PML, tel qu'un interféron, en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable;

lesdites compositions pharmaceutiques étant destinées à une administration simultanée ou séquentielle.

15 Le mode d'administration et la posologie dépendent de l'affection traitée et de son stade d'avancement, ainsi que du poids, de l'âge et du sexe du patient.

Conformément à l'invention, la formulation des médicaments de l'invention permet une administration notamment par voie orale, anale, nasale, intra-musculaire, intra-dermique, sous-cutanée, ou intra-veineuse.

20 La dose d'administration envisagée peut être par exemple de 1 à 50 mg par jour, de préférence par voie intraveineuse, pour les composés de l'arsenic, de 1 à 250 mg par kg de poids corporel de substrats de caspases tels que le zVAD, et de 1 à 20 millions d'unités internationales (M UI), de préférence de 3 à 5 M UI, de préférence par voie intra-musculaire ou sous-cutanée, par jour

25 ou tous les deux jours, pour l'interféron.

Les auteurs de l'invention ont en outre découvert que la mort cellulaire induite par la surexpression de la protéine PML localisée sur les corps nucléaires présente des caractéristiques différentes de l'apoptose induit par les caspases. Dans le cas de la mort cellulaire induite par la PML, on n'observe en

30 particulier pas les caractéristiques morphologiques nucléaires typiques de l'apoptose, telles que la condensation de la chromatine et la fragmentation nucléaire.

De plus, alors que la mort cellulaire induite par les interférons seuls présente les caractéristiques de l'apoptose, les auteurs de la présente invention

ont observé que l'association synergique de zVAD avec les interférons fait disparaître ce phénotype apoptotique, la mort cellulaire présentant alors des caractéristiques différentes de celles de l'apoptose.

5 Une des conséquences majeures de cette découverte est la capacité des cellules indésirables tuées par le mécanisme induit par la PML de provoquer une réaction immunitaire contre des cellules indésirables similaires qui auraient échappé à la mort médiée par la protéine PML (Melcher et al, 1998, Nature Medicine, vol 4, n° 5, pp 581-587).

10 Cette propriété rend particulièrement intéressante l'utilisation d'une substance choisie parmi les composés de l'arsenic, les composés ayant les mêmes propriétés biologiques que l'arsenic, et les inhibiteurs et/ou substrats des caspases, de préférence en association avec un interféron, pour induire la mort de cellules indésirables, dans la mesure où ladite substance induit également une réaction immunitaire subséquente à l'encontre des cellules indésirables.

15 Elle peut également être mise à profit pour traiter *ex vivo* un ensemble de cellules susceptibles de contenir des cellules indésirables, avant administration à un patient, par exemple une préparation de moelle osseuse destinée à une greffe chez un patient leucémique, une telle préparation contenant généralement quelques cellules malignes résiduelles. Un tel traitement
20 permet non seulement d'induire la mort des cellules indésirables contenues dans la préparation, mais encore de provoquer une réaction immunitaire dirigée contre les cellules indésirables présentes dans le corps du patient à qui la préparation cellulaire traitée est administrée.

25 La présente invention a donc également pour objet un procédé *in vitro* pour induire la mort de cellules indésirables comprenant la mise en contact de cellules indésirables avec une substance choisie parmi les composés de l'arsenic, les composés ayant les mêmes propriétés biologiques que l'arsenic, et les inhibiteurs et/ou substrats des caspases, ladite substance pouvant être de préférence associée à la protéine PML et/ou à un agent induisant la
30 surexpression de la protéine PML, de préférence un interféron.

Les exemples et figures suivants illustrent l'invention sans en limiter la portée.

LEGENDE DES FIGURES

- La figure 1A représente l'induction de la protéine PML de 90 kD dans un clone REF(T)PML, quatre heures après exposition à des concentrations variables de ZnCl_2 .
- La figure 1B représente une analyse par FACS de cellules REF(T)PML ou de cellules contrôle, quatre heures 30 après exposition à 150 μM de ZnCl_2 . Le panneau de gauche représente le contenu en ADN par rapport à la taille des cellules. Les panneaux de droite représente le contenu en ADN en fonction de la fluorescence (TUNEL).
- La figure 1C représente l'analyse cytométrique des cellules REF(T)PML traitées ou non avec du ZnCl_2 , de l'étoposide, ou l'inhibiteur de caspase zVAD. Un marquage est effectué avec de l'Annexine V-FITC (panneau de gauche) ou de la Rhodamine 123 (panneau de droite). Le pourcentage en cellules apoptotiques est indiqué.
- La figure 2A représente l'absence de clivage de la PARP lors de la mort cellulaire déclenchée par la PML. Les cellules ont été traitées avec 150 μM de ZnCl_2 , de l'étoposide ou du zVAD.
- La figure 2B représente l'activité de la caspase CPP32 déterminée par coupure du DEVD-pNA dans des cellules REF(T) contrôle ou des cellules REF(T)PML. Les absorbances relatives de trois déterminations indépendantes sont présentées.
- La figure 3A montre la survie des monocytes traités avec 1000 U/ml d'IFN α . Une expérience représentative sur cinq est présentée. Les tests TUNEL démontrent que la diminution de la numération cellulaire est due à l'éoptose.
- La figure 3B représente des histogrammes indiquant l'effet du zVAD (100 μM) 24 heures après l'addition de celui-ci. Les valeurs moyennes \pm les écarts-type de 11 expériences sont présentées.
- La figure 4A montre que le zVAD stabilise la protéine PML dans les cellules REF(T).

- La figure 4B montre que l'interféron α (1 000 U/ml) induit la PML de rat dans les cellules REF(T)PML. Les flèches indiquent des isoformes distincts de la PML.

5

EXEMPLES

MATERIELS ET METHODES

10

- Construction plasmidique

15

Un fragment *SacI-BglII* (- 69, + 55 paires de base) du promoteur de la métallothionéine de souris a été inséré dans un plasmide pKS et a été fusionné avec un fragment *BglII-BamHI* d'un ADNc de PML conduisant au plasmide pKSmMT-PML. Pour la fusion GFP-PML, le même fragment PML a été inséré dans le site *BglII* du vecteur pEGFP-1 (Clontech). Un vecteur rétroviral exprimant PML a été également construit par insertion d'un ADNc de pleine longueur de PML (de Thé et al, 1991) au site *EcoRI* de SR α tkneo (Muller et al, 1991).

- Culture cellulaire

20

25

30

Les cellules REF(T) et MEF(T) sont des fibroblastes embryonnaires de rats et de souris immortalisées par un vecteur d'expression SV40T. Les cellules REF(K1) sont immortalisées par un mutant SV40T qui ne lie pas Rb, et les cellules F111 sont des fibroblastes de rat 3T3 spontanément immortalisés. Pour des essais de clonogénicité, les cellules ont été transfectées avec 10 μ g de SR α tkneo-PML ou SR α tkneo sur des boîtes de culture de 10 cm de diamètre et sélectionnées par de la néomycine (500 μ g/ml). Pour obtenir des clones inducibles, un pool de cellules REF(T) a été co-transfecté avec le plasmide pKSmMt-PML et un vecteur de résistance à l'hygromycine (DSP-Hygro). Les colonies résistantes ont été examinées pour l'expression de la PML après quatre heures d'un traitement au ZnCl_2 (150 μ M) et soumises à un deuxième cycle de clonage par dilution limite. Des clones CHO inductible ont été construits de manière similaire. Les monocytes ont été préparés selon la méthode d'Estaquier et al, 1997. L'étoposide (utilisé à 100 μ M pendant 16 à 24 heures) a été obtenu auprès de Biomol Research Laboratories, le zVAD (benzyloxycarbonyl-Val-Ala-

Asp fluorométhylcétone, utilisé à 250 µg/ml) est commercialisé chez Bachem et l'IFN α de rat chez Access BioMedical. L'interféron α humain a été fourni par Schering-Plough. Les anticorps contre la protéine PML humaine sont décrits dans l'article de Daniel et al, 1993. Les expériences de Western Blot avec la protéine PML de rat endogène ont été réalisées avec l'anticorps monoclonal 5E10 qui détecte à la fois la PML de rat et la PML humaine.

La protéine Bax a été détectée en utilisant un sérum polyclonal de lapin purifié dirigé contre les acides aminés 80-98 (SC930 Santa Cruz). Un autre anticorps polyclonal de lapin dirigé contre un autre peptide (acide aminés 11-30) (FC 793 Santa Cruz) et un anticorps monoclonal Zymed ont donné des résultats similaires. La p27 kip a été détectée en utilisant un anticorps monoclonal (Transduction laboratories).

- Evaluation de la mort cellulaire

Les cellules ont été traitées pendant 2 heures avec 150 µM de ZnCl₂ (sauf indications contraires) en présence ou l'absence de sérum de veau foetal inactivé par la chaleur, puis les cellules ont été lavées et incubées dans un milieu sans ZnCl₂. Le test TUNEL a été réalisé selon les indications du fabricant (Boehringer Mannheim, kit de détection de la mort cellulaire *in situ*), à l'exception de l'étape de fixation (4 % de formaldéhyde dans du tampon phosphate EBS pendant 10 minutes). La teneur en ADN cellulaire a été évaluée par une incubation de 10 minutes dans de l'iodure de propidium à 50 µg/ml, en présence de Rnase A à 100 µg/ml à 4°C. L'analyse de l'expression de la phosphatidylsérine sur le feuillet externe des membranes cellulaires a été réalisée en utilisant un marquage Annexine-V-fluos (Boehringer Mannheim) et une perte de la polarité mitochondriale par Rhodamine 123 (Molecular probes) selon les instructions du fabricant. Les échantillons ont été analysés sur un analyseur FACScan (Lysis II software Becton Dickinson). Pour le clivage de substrat par les caspases, 5.10⁶ cellules ont été lavées dans du tampon PBS, et incubées pendant une heure à 4°C dans 200 µl de tampon de lyse (10 mM Hepes, pH 7,4, 2 mM EDTA, 2 mM DTT, 0,1 % CHAPS). Après centrifugation, 20 µl de surnageant et 180 µl de tampon de réaction (100 mM Hepes, pH 7,4, 2 % de glycérol, 5 mM DTT, 0,5 mM EDTA, 50 µM DEVD-pNA (Biomol Research

Laboratories)) ont été mélangés et l'absorbance à 405 nm a été mesurée après quatre heures d'incubation à 37°C. L'anticorps polyclonal SA-252 anti-PARP est commercialisé chez Biomol Research Laboratories.

5

EXEMPLE 1 :

La PML induit une mort cellulaire indépendante du zVAD.

La transfection d'un vecteur d'expression de la PML (pSG5-PML) dans différentes lignées cellulaires de fibroblastes a fortement diminué la formation de foyers. La protéine PML étant indétectable dans les clones obtenus à partir des cellules transfectées par la PML, ces résultats impliquent que la PML exerce un effet inhibiteur majeur soit sur le cycle cellulaire soit sur la survie des cellules. Pour comprendre le mécanisme à la base de cet effet, un pool de fibroblastes d'embryons de rat (REFs) transformés par SV40T a été transfecté avec un plasmide pKSmMT-PML, dans lequel l'expression de PML est sous le contrôle d'un promoteur de la métallothionéine de souris. Trois des clones résultant REF(T)PML ont été étudiés par la suite, tandis que trois clones REF(T) porteurs du vecteur vide ont été testés comme contrôle. La protéine PML a été détectée par Western Blot deux heures après exposition au ZnCl_2 (expression détectable à partir de 50 μM de ZnCl_2 et présentant un plateau à 150 μM de ZnCl_2) (figure 1A). L'expression de la PML a induit une mort cellulaire synchronisée de l'ensemble de la population cellulaire avec des cinétiques variant de 48 heures pour 50 μM de ZnCl_2 à six heures pour 150 μM . Dans les trois clones REF(T)PML, des modifications morphologiques ont été observées à partir de trois heures après induction avec 150 μM de ZnCl_2 . Les cellules s'arrondissent, avec un rétrécissement clair du cytoplasme (figure 1B), sont devenues positives dans un test TUNEL (figure 1B) puis se sont progressivement détachées de la boîte. Elles ont cependant gardé leur capacité à exclure le bleu trypan. Ces modifications ont été associées avec une teneur en ADN subG1 modeste (figure 1B), une externalisation de la phosphatidylserine membranaire (figure 1C) et une perte du potentiel transmembranaire mitochondrial (figure 1C). Tandis que des modifications similaires ont été observées dans l'apoptose induite

par l'agent génotoxique étoposide, elles n'ont jamais été trouvées dans les cellules contrôle REF(T) traitées avec ZnCl_2 (figures 1B et C). Contrairement au traitement par l'étoposide, la mort cellulaire induite par la PML n'est pas associée avec des caractéristiques morphologiques nucléaires typiques de l'apoptose telles que la condensation de la chromatine et la fragmentation nucléaire, même tardives dans le processus de mort cellulaire. Malgré le clivage de l'ADN (sub-G1 positif (figure 1B) et perte de la viscosité de l'ADN), la mort cellulaire induite par la PML n'est pas associée avec une échelle de l'ADN internucléosomale, en conformité avec le faible signal positif du TUNEL (figure 1B).

Contrôles :

Comme les cellules REF(T) sont des lignées cellulaires transformées par SV40T, plusieurs expériences ont été réalisées pour exclure une contribution de l'oncogène « grand T » du virus SV40 à la mort cellulaire induite par la PML. Premièrement, l'expression de la PML n'a pas altéré l'expression ou la localisation de SV40T dans les cellules REF(T)PML ni n'a dégradé la p53 ou la libération de p53 à partir de l'oncogène « grand T » du virus SV40. Deuxièmement, dans les cellules HeLa ou CHO transfectées de manière transitoire avec soit une protéine de fusion GFP-PML ou du GFP seul, toutes les cellules GFP-PML positives se sont progressivement détachées de la boîte et sont mortes, contrairement aux cellules GFP positives contrôle. Troisièmement, dans les cellules CHO transfectées de manière stable avec le plasmide pKSmMT-PML, l'induction par le ZnCl_2 a là encore conduit à la mort des clones exprimant la protéine PML. Enfin, dans les cellules REF exprimant un mutant thermosensible SV40T, la dégradation des SV40T à 39,5°C n'a pas affecté la mort cellulaire déclenchée par la PML.

L'induction de la mort cellulaire peut requérir une transcription *de novo* ou peut refléter le déclenchement de voies préexistantes. Les cellules REF(T)PML ont été tout d'abord incubées avec ZnCl_2 et avec du cycloheximide pendant deux heures permettant ainsi la synthèse d'ARNm de PML, et non pas sa traduction. Les cellules ont ensuite été lavées et incubées avec de l'actinomycine D seule pour permettre la traduction de l'ARNm de PML mais pas la néosynthèse ARNm. Dans cette expérience, la mort cellulaire a été observée

de même qu'en absence d'inhibiteur, montrant que la transcription *de novo* n'est pas requise. Une mort induite par la PML ne nécessite pas et n'induit pas la transition vers la phase S du cycle cellulaire. En effet, la PML déclenche toujours la mort dans les cellules REF(T)PML qui ont été bloquées au stade G1/S par un traitement à l'aphidicoline. De plus, une exposition au BrdU à différents temps après induction par ZnCl_2 a montré que la réplication de l'ADN n'était pas modifiée jusqu'à deux heures mais était arrêtée après trois heures et que la mort cellulaire était présente dans toutes les phases du cycle cellulaire (figure 1B).

10

EXEMPLE 2 :

L'arsenic favorise la mort cellulaire déclenchée par la PML.

Lorsque les cellules REF(T)PML ont été traitées avec du ZnCl_2 et 10^{-6} M d' As_2O_3 , une vive accélération dans les modifications morphologiques associées à la mort cellulaire a été observée. Le clivage de l'ADN déterminé par des tests TUNEL a augmenté de manière similaire (117 % de cellules positives pour le co-traitement avec ZnCl_2 contre 45 % pour ZnCl_2 seul, tandis que As_2O_3 seul n'a induit aucune augmentation par rapport au niveau de base). Le fait que l'arsenic augmente l'induction de la mort cellulaire en parallèle à la localisation de la PML sur les corps nucléaires suggère que la localisation de la PML vers les corps nucléaires est importante pour la mort cellulaire.

EXEMPLE 3 :

La mort déclenchée par la PML n'est pas associée à l'activation des caspases.

Il est connu que l'exécution de la mort cellulaire programmée implique l'activation protéolytique de caspases qui induisent les changements phénotypiques de l'apoptose par clivage de protéines nucléaires et cytoplasmiques (Salvesen et al, 1997). L'inhibiteur de caspases zVAD qui bloque l'apoptose induite par l'étoposide, n'inhibe pas la mort cellulaire induite par la

PML (figure 1C) et même de manière paradoxale l'accélère (71 % de signal positif TUNEL avec du zVAD et du ZnCl_2 contre 45 % avec du ZnCl_2 seul). Ces observations impliquent que les exécutants sensibles à la zVAD ne sont pas requis pour la mort cellulaire induite par la PML. De plus, la CPP32 (caspase 3), la principale caspase impliquée dans l'apoptose, apparaît ne pas être activée durant la mort cellulaire induite par la PML, dans la mesure où, un de ses substrats, la PARP (poly(ADP-ribose)polymérase) reste non clivé (figure 2A). Contrairement à l'étoposide, aucun clivage significatif des substrats de la caspase colorimétrique, YVAD-pNa (caspase de classe 1, Boehringer Mannheim) et DEVD-pNA (caspase de classe 3, Boehringer Mannheim) après induction par la PML n'a pu être détecté (figure 2B).

EXEMPLE 4 :

L'arsenic et le zVAD potentialisent la mort cellulaire induite par la PML et les interférons.

Des monocytes primaires exposés à l'interféron α ont subi une mort cellulaire progressive qui a conduit à la disparition complète de la culture cellulaire après sept jours (figures 3A et 3B). Lors de l'addition de zVAD avec l'interféron α , la mort de l'ensemble de la population cellulaire a été observée dans les 24 heures en l'absence de la fragmentation nucléaire et de la condensation de la chromatine observée avec l'interféron seul (figures 3A et 3B). Peu ou aucune mort cellulaire n'a été observée avec du zVAD seul pendant 20 jours dans la plupart des cultures primaires (8/11) (figures 3A et 3B). Dans trois cultures sur onze, le zVAD seul a induit la mort d'une partie de la culture après sept jours, ces résultats reflétant probablement une sécrétion endogène d'interféron. Des résultats similaires ont été obtenus avec d'autres inhibiteurs de caspase tel que le DEVD.

Le tableau ci-dessous représente la mort cellulaire évaluée par tunnel de cellules REF(T)PML traitées pendant deux jours avec 1 000 U/ml d'IFN α et 10^{-6} M d'As $_2$ O $_3$ ou de zVAD.

	IFN α	
	-	+
Contrôle	5 %	42 %
ZVAD	5 %	60 %
As ₂ O ₃	5,5 %	63 %

5

Dans les cellules REF(T), une synergie importante a été trouvée entre soit l'interféron α et le zVAD, soit l'interféron α et l'As₂O₃ (42 % de signal positif TUNEL pour l'interféron α seul, et 60 % et 63 % avec zVAD et arsenic respectivement).

10

Le zVAD a augmenté les niveaux d'expression de la PML (figure 4A) et l'arsenic a augmenté son association avec les corps nucléaires, alors que la quantité totale en PML a été diminuée. La similarité de la synergie du zVAD et de l'arsenic avec les morts cellulaires déclenchées par la PML et l'interféron suggère que la PML est impliquée par la mort cellulaire induite par l'interféron. De plus, l'interféron α induit la mort cellulaire avec les mêmes cinétiques que le ZnCl₂ 50 μ M et les deux induisent des quantités similaires de protéine PML (figure 4B).

15

20

EXEMPLE 5 :

La protéine PML entraîne les protéines Bax et p27 vers les corps nucléaires.

25

Bax et p27 sont connus comme étant deux produits de gènes proapoptotiques. Le double marquage avec des anticorps anti-PML et anti-Bax a

montré un marquage cytoplasmique de la protéine Bax et la co-localisation des protéines Bax et PML nucléoplasmiques endogènes sur les corps nucléaires en utilisant trois anticorps différents dirigés contre des portions distinctes de Bax. La surexpression de PML ou PML/RAR α dans les cellules HeLa a induit le recrutement de Bax endogène sur les structures marquées par la PML, suggérant fortement un contact entre Bax et la PML. La microscopie immuno-électronique a démontré une association préférentielle de Bax sur la périphérie des corps nucléaires comme montré précédemment pour la PML. Pour s'assurer que le recrutement de Bax intervient aussi dans des cellules non transfectées, des cellules HeLa ont été traitées avec de l'interféron et/ou de l'arsenic qui induit à la fois l'expression de la PML et son ciblage vers les corps nucléaires. L'interféron seul a recruté Bax et induit la mort cellulaire. L'arsenic a favorisé à la fois le recrutement de Bax et la mort cellulaire. Comme la quantité totale en Bax ne varie pas, ces modifications résultent du recrutement de Bax sur les corps cellulaires.

Des observations pratiquement similaires ont été faites avec l'inhibiteur cdk p27/kip (cycline dependent kinase inhibitor), qui est partiellement associé aux corps nucléaires et recruté par un traitement IFN/arsenic. Les protéines Bax et p27 sont ainsi identifiées comme étant de nouveaux antigènes liés aux corps nucléaires impliqués dans l'induction de la mort cellulaire.

REVENDICATIONS

5 1. Utilisation d'au moins une substance favorisant l'adressage de la protéine PML vers les corps nucléaires et/ou sa stabilisation pour la fabrication d'un médicament destiné à induire la mort de cellules indésirables, à l'exception des cellules leucémiques de la leucémie promyélocytique aiguë lorsque l'adit substance est un composé de l'arsenic.

10 2. Utilisation d'au moins une substance choisie parmi les composés de l'arsenic, les composés ayant les mêmes propriétés biologiques que l'arsenic, et les inhibiteurs et/ou substrats des caspases, pour la fabrication d'un médicament destiné à induire la mort de cellules indésirables, à l'exception des cellules leucémiques de la leucémie promyélocytique aiguë lorsque ledit composé est un composé de l'arsenic.

15 3. Utilisation selon l'une des revendications 1 ou 2 dans laquelle l'adit substance est associée à la protéine PML et/ou à un agent induisant la surexpression de la protéine PML, l'administration de ladite substance et l'administration de la protéine PML et/ou dudit agent induisant la surexpression de la protéine PML étant simultanées ou
20 séquentielles.

 4. Utilisation selon la revendication 3 dans laquelle ledit agent induisant la surexpression de la protéine PML est un interféron, tel que l'interféron α ou β .

25 5. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, dans laquelle ladite substance est le trioxyde d'arsenic.

 6. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, dans laquelle ladite substance est le zVAD.

30 7. Procédé *in vitro* pour induire la mort de cellules indésirables comprenant la mise en contact de cellules indésirables avec une substance choisie parmi les composés de l'arsenic, les composés ayant les mêmes propriétés biologiques que l'arsenic, et les inhibiteurs et/ou substrats des caspases.

8. Procédé selon la revendication 7 dans lequel ladite substance est associée à la protéine PML et/ou à un agent induisant la surexpression de la protéine PML, de préférence un interféron.

9. Composition pharmaceutique contenant

5 2) soit au moins un inhibiteur et/ou substrat des caspases associé à :

- au moins un composé de l'arsenic ou un composé ayant les mêmes propriétés biologiques que l'arsenic;

- et/ou la protéine PML

- et/ou au moins un agent induisant la surexpression de la protéine PML, tel qu'un interféron;

10 en présence d'un véhicule pharmaceutiquement acceptable ;

2) soit au moins un composé de l'arsenic ou un composé ayant les mêmes propriétés biologiques que l'arsenic associé à la protéine PML et/ou à au moins un agent induisant la surexpression de la protéine PML, tel qu'un interféron, en

15 présence d'un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

10. Kit comprenant

c) - une composition pharmaceutique (1) contenant au moins un inhibiteur et/ou substrat des caspases, en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable ;

20 - et/ou une composition pharmaceutique (2) contenant au moins un composé de l'arsenic ou un composé ayant les mêmes propriétés que l'arsenic, en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable ; et

d) - une composition pharmaceutique (3) contenant la protéine PML en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable;

25 - et/ou une composition pharmaceutique (4) contenant au moins un agent induisant la surexpression de la protéine PML, tel qu'un interféron, en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable;

lesdites compositions pharmaceutiques étant destinées à une administration simultanée ou séquentielle.

8. Procédé selon la revendication 7 dans lequel ladite substance est associée à la protéine PML et/ou à un agent induisant la surexpression de la protéine PML, de préférence un interféron.

9. Composition pharmaceutique contenant

5 1) soit au moins un inhibiteur et/ou substrat des caspases associé à :

- au moins un composé de l'arsenic ou un composé ayant les mêmes propriétés biologiques que l'arsenic;

- et/ou la protéine PML

- et/ou au moins un agent induisant la surexpression de la protéine PML, tel qu'un interféron;

10. en présence d'un véhicule pharmaceutiquement acceptable ;

2) soit au moins un composé de l'arsenic ou un composé ayant les mêmes propriétés biologiques que l'arsenic associé à la protéine PML et/ou à au moins un agent induisant la surexpression de la protéine PML, tel qu'un interféron, en présence d'un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

15

10. Kit comprenant

a) - une composition pharmaceutique (1) contenant au moins un inhibiteur et/ou substrat des caspases, en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable ;

20

- et/ou une composition pharmaceutique (2) contenant au moins un composé de l'arsenic ou un composé ayant les mêmes propriétés que l'arsenic, en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable ; et

b) - une composition pharmaceutique (3) contenant la protéine PML en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable;

25

- et/ou une composition pharmaceutique (4) contenant au moins un agent induisant la surexpression de la protéine PML, tel qu'un interféron, en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable;

lesdites compositions pharmaceutiques étant destinées à une administration simultanée ou séquentielle.

30

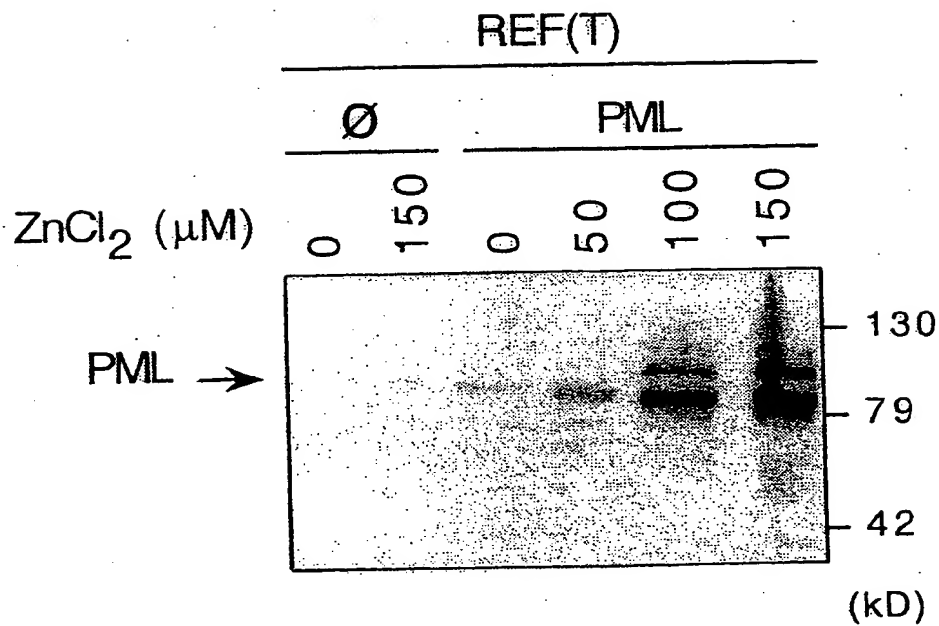
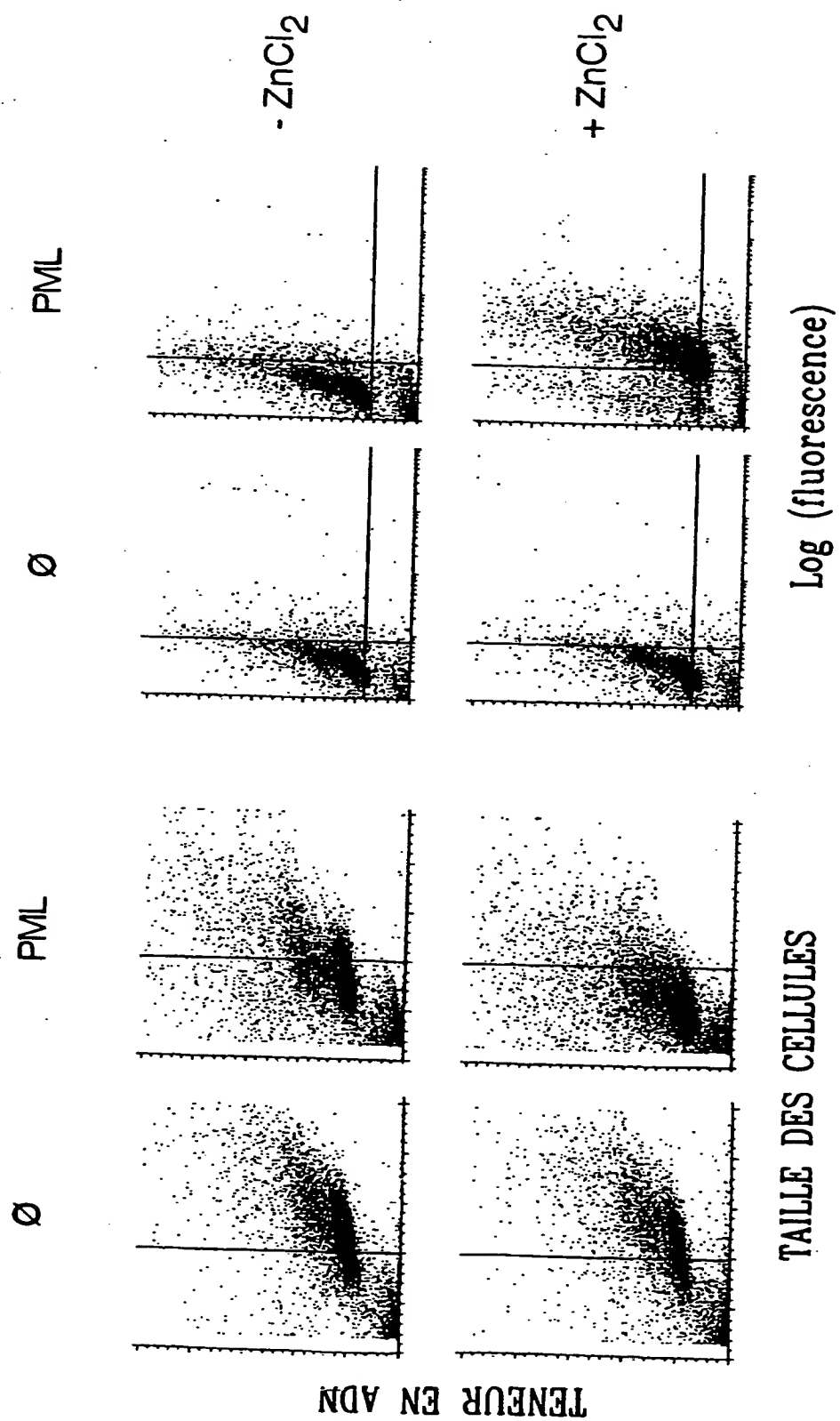
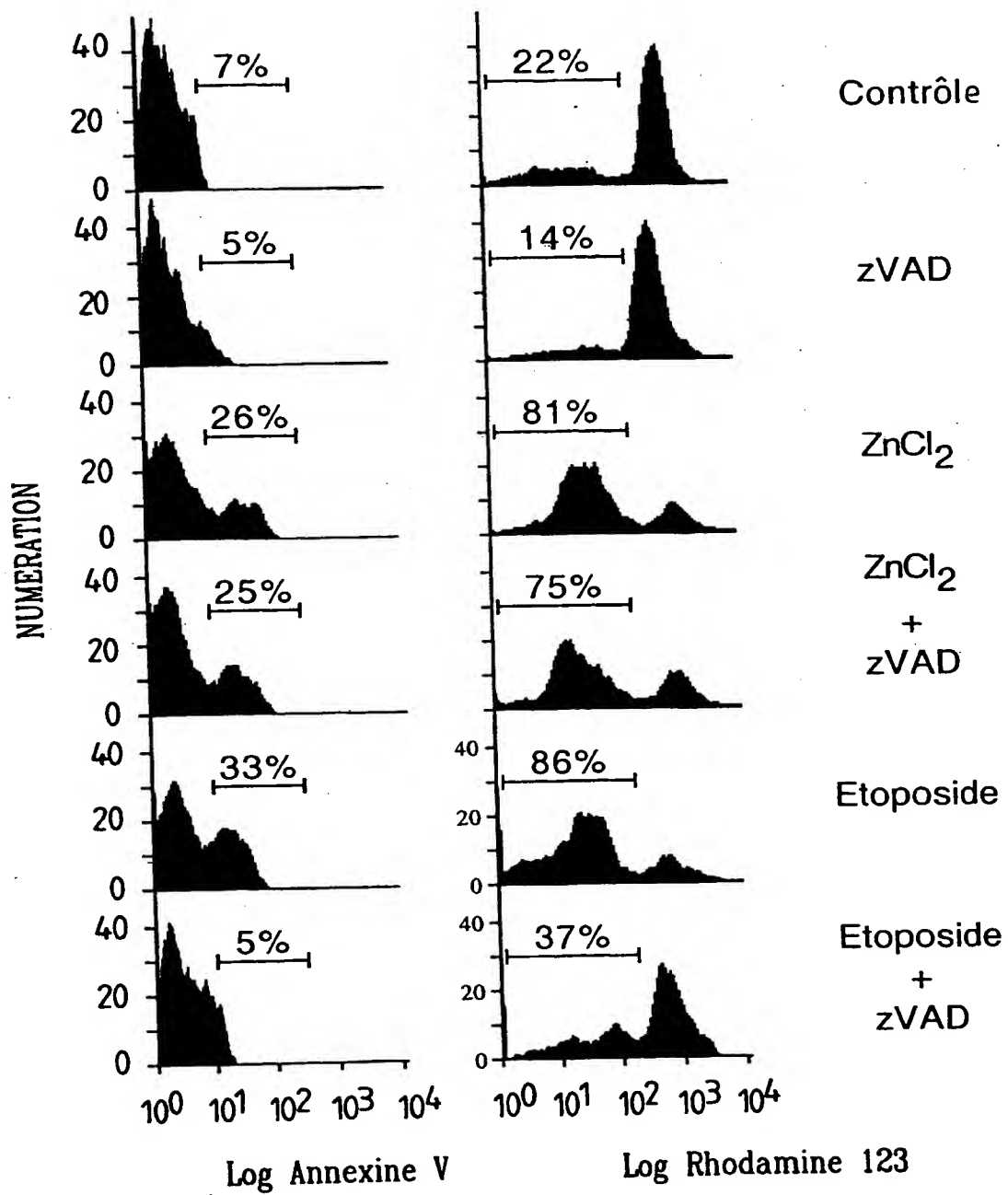


FIG.1A

2/7

FIG.1B

3/7

FIG. 1C

4/7

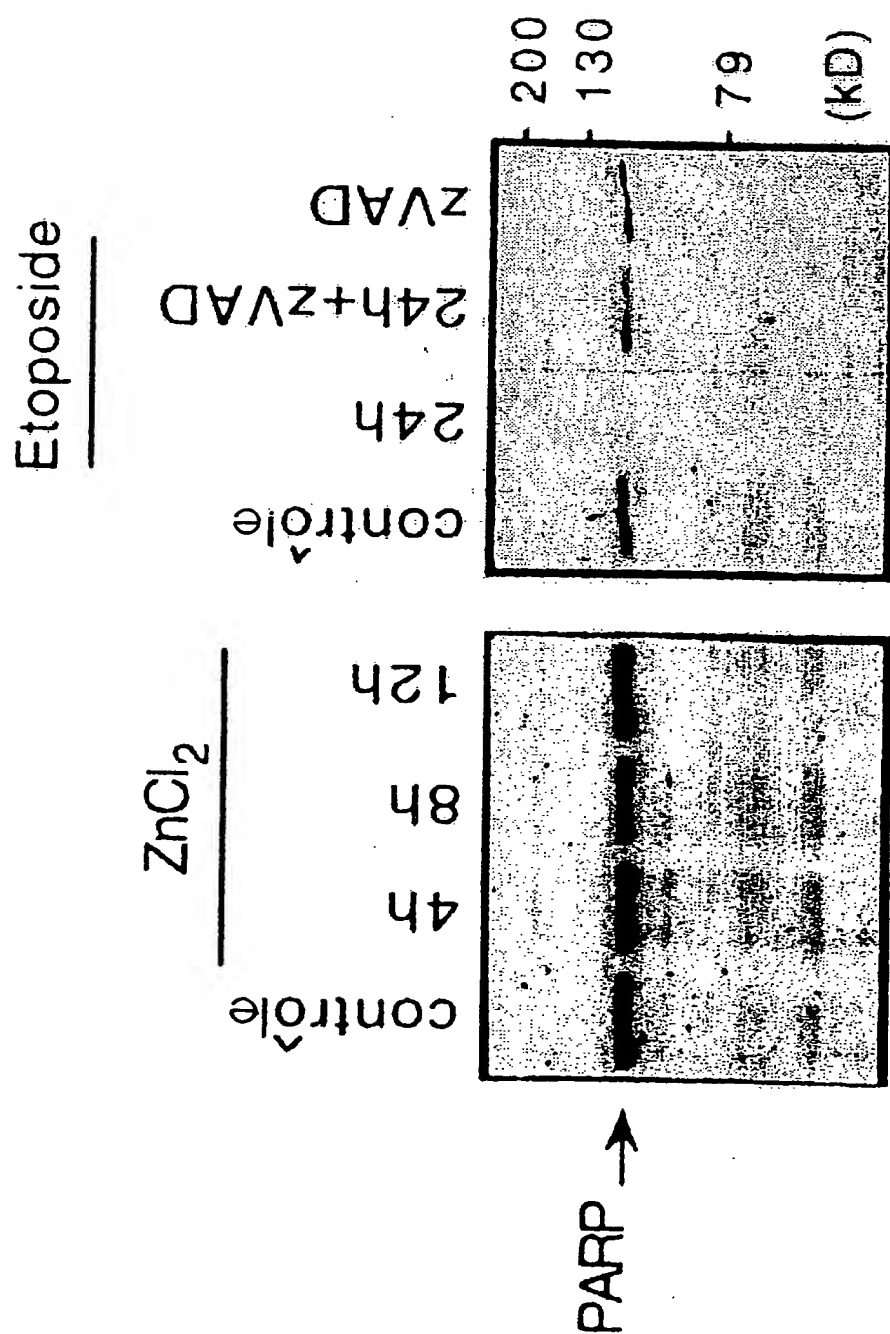
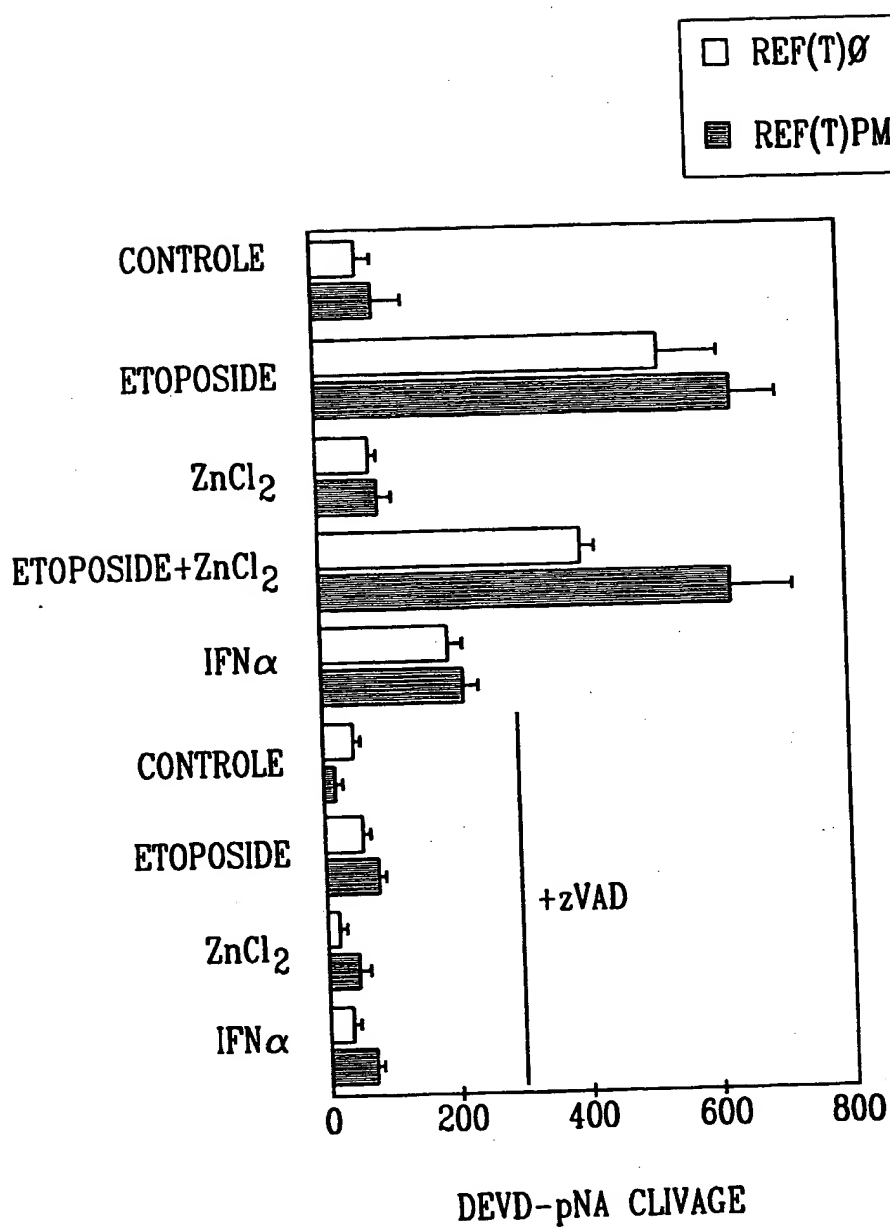
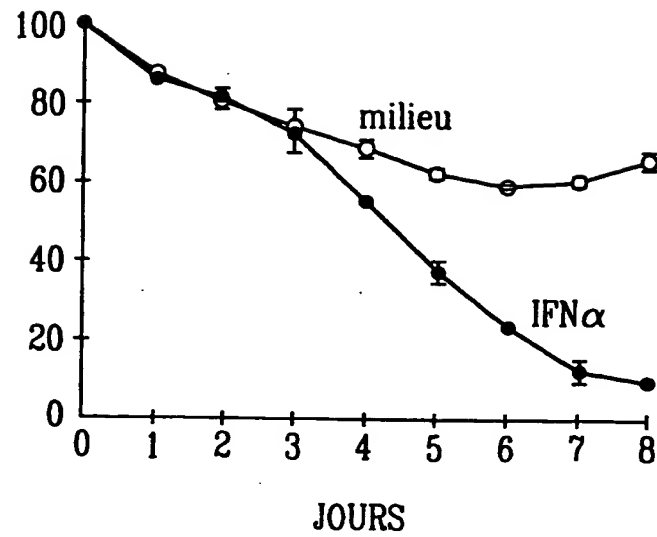
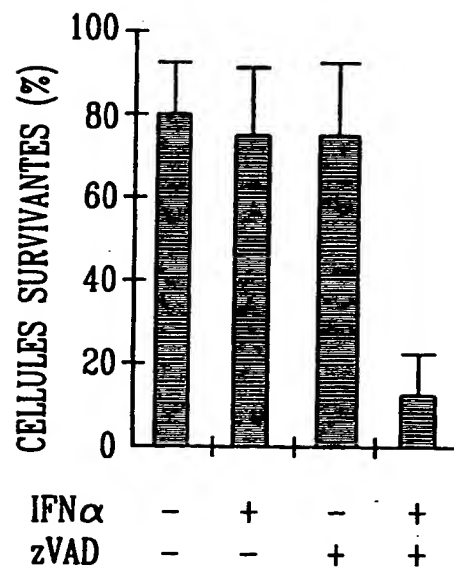


FIG. 2A

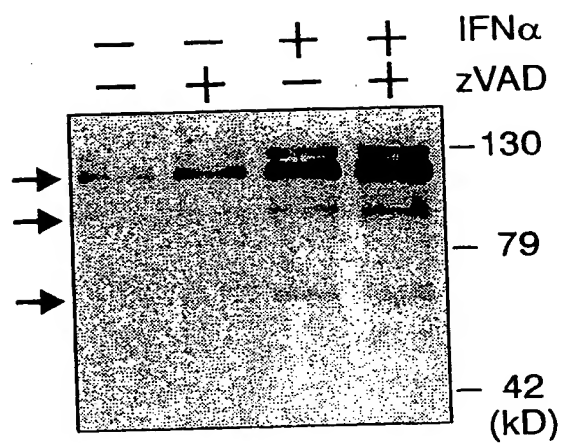
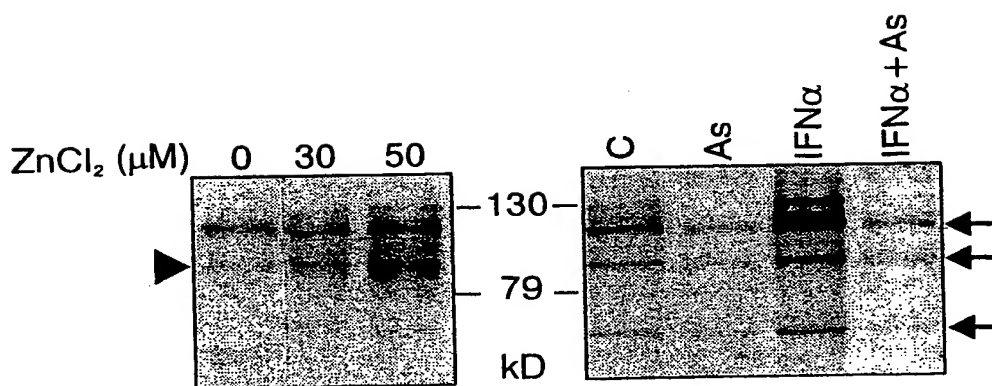
5/7

FIG.2B

6/7

FIG.3AFIG.3B

7/7

FIG. 4AFIG. 4B

